出國報告

日本分子標誌輔助育種之策略與成果－赴PGC參訪心得

農試所技服組 呂秀英　農試所生技組 陳烈夫
中央研究院 鄔宏潘　農委會 林學正

一、前言

在國際上，分子標誌 (molecular marker) 在作物品種鑑定、遺傳多樣性、基因定位、種子純度檢測及輔助育種的應用價值，越顯重要。作物品種改良的程序，就是以攜帶理想性狀的材料與需改良的品種相雜交再經過選拔而獲得的程序。相對於傳統的育種程序，分子標誌因為具有可以鑑別單一個體（甚至單粒種子）之基因型、鑑別效果不受植物生長發育的時期和環境影響、可由植物任何生育階段或組織取樣分析、可追蹤基因轉移的情況等優勢，因此有助於早期選種、提高選拔效率。如果分子標誌與目標基因相連鎖，就可以在早期篩選作物分離群中含目標基因的植株。在育種過程中藉由分析與目標基因緊密連鎖的分子標誌來判斷目標基因是否存在，以選擇理想基因型的技術，稱為分子標誌輔助育種 (marker-assisted selection, MAS)。作物的大多數經濟性狀為微效多基因控制的數量性狀（如產量），如何提高育種選拔效率一直是育種家關注的問題，儘管目前利用MAS選擇這類複雜性狀的應用仍存在諸多困難，但MAS在未來育種中的作用是無庸置疑的，其將日益成為育種家不可或缺的方法。

在日本，於2000年二月成立的植物基因體中心（Plant Genome Center, PGC），目前員額46名，資本額1,701,600千日圓，專門從事基因功能研究開發之資訊化、研發成果販賣、相關機械試藥耗品販賣、種苗改良及販賣等。目前PGC保存植物遺傳資源超過1,000個品種，基因構造解析已獲10,000個以上的單核苷酸多型性（single nucleotide polymorphism, SNP），完成多項基因機能解析及機能成份分析，3年內已育成17個水稻品種並已對外販賣種子。至2008年止，已累積有專利1,590個，技術轉移35個，生產地域17個縣。PGC的水稻新品種之育成，主要採用MAS，績效顯著，為該公司賺取了不少利潤。因此，本文特將於2008年九月十二日參訪日本PGC（圖一）之水稻育種的見聞及心得，摘要說明於後，以期分享並提供相關研究人員參考。

作　　者：呂組長秀英
連絡電話：04-23302301-7450

二、日本分子標誌輔助育種之執行策略與研發成果

在日本，越光 (Koshihikari) 是非常受歡迎的優良食味水稻品種，幾乎日本所有水稻品種都是越光及其雜交後代。越光在日本的栽培面積佔36.7%，但適栽地僅限於日本中部地區22縣，在北海道和東北地區無法栽培，必須使其早熟；而越光在關東以西、九州、沖繩一帶栽培困難，除非晚熟。因此PGC的水稻育種目標在於如何改良越光品種，使其短桿抗倒伏、生產效率高，並調整開花期，使其早熟能適應於北海道及東北部地區氣候，以及晚熟能種植於近畿、四國、九州及琉球等地區；另外也改良製酒用山田錦稻米，使其短桿適於機械採收，並調節開花期擴大其適應區域。目前PGC藉由MAS，已育成17個改良型越光品種，列如（表一），其中已通過品

圖一、參訪日本植物基因體中心(PGC)，聽取社長美濃侑部三(右二)、門奈理佐博士(右一)、王子軒博士(左一)、北澤 則之博士(左二)的簡報，並參觀相關設施和研發成果。由右三至右六依次為訪問成員鄔宏潘博士、林學正技監、呂秀英組長及陳烈夫助理研究員。

表一、日本植物基因體中心(PGC)利用分子標誌輔助育種所育成之水稻新品種

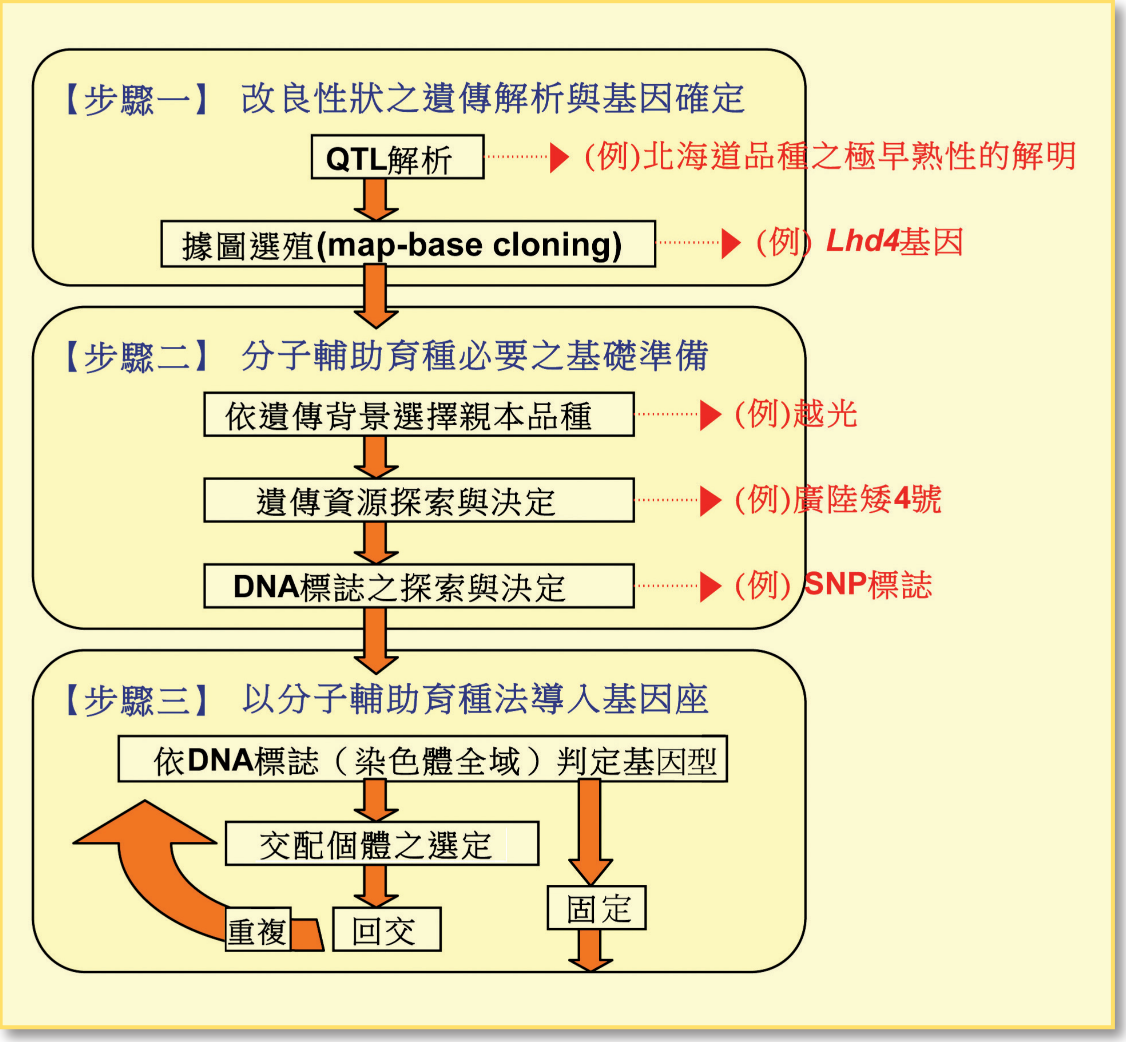
品 種 名	品 種 特 性	研 發 現 況	品種登錄申請
越光筑波SD1號	短桿抗倒伏、生產效率高的優良食味品種	已推廣	已公告
筑波SD2號	短桿抗倒伏、生產效率高且低Amylose型的優良食味品種	已推廣	已公告
越光筑波HD1號 (早熟2週)	越光之開花期提前2週，適合東北地區北部地方栽培的優良食味品種	品種登錄申請	2008年 已申請公告
越光富筑波SDBL 1號-10號 (移除7號只剩9 品種)	短桿抗病性強、生產效率高的優良食味品種(富山縣共同研究)	品種登錄申請	2008年 已申請公告
早熟型越光(1週)	越光之開花期提前1週，適合東北地區南部地方栽培的優良食味品種	試驗田栽培階段	2008年 預定申請
早熟型越光(3週)	越光之開花期提前3週，適合北海道栽培的優良食味品種	試驗田栽培階段	2008年 預定申請
晚熟型越光(3天)	越光之開花期延後3天，適合關東以西栽培的優良食味品種	試驗田栽培階段	2008年 預定申請
晚熟型越光(4天)	越光之開花期延後4天，適合關東以西栽培的優良食味品種	試驗田栽培階段	2008年 預定申請
晚熟型越光(2週)	越光之開花期延後2週，適合九州、沖繩栽培的優良食味品種	試驗田栽培階段	2008年 預定申請

資料來源：(摘自PGC提供之文件資料)

種權且已推廣的品種為越光筑波SD1號和筑波SD2號之短桿抗倒伏品種，其他15個調節開花期的改良型越光品種也已申請品種登記或正在試驗田栽培階段。

PGC的水稻MAS之策略流程如圖二所示：

【步驟一】：首先建構改良性狀之遺傳圖譜及基因定位。建構分子標誌遺傳連鎖圖，一般需要選擇具有相對性狀的作物純系A和B進行雜交和自交，以獲得分離世代F_2、回交BC (back cross) 或加倍單倍體DH (double haploid) 和重組近交系RL (recombination in breeding line) 等；並對親本A、B以及世代群體中每一個體的分子標誌進行檢測，而後再藉由一定程序的統計分析來算出分子標誌間的連鎖距離，最後建構出該群體的遺傳連鎖圖。分子標誌與數量性狀基因座 (quantitative trait locus, QTL) 的連鎖越緊密，MAS的效率就越高。以日本改良越光品種開花期之MAS為例，利用極早熟和晚熟品種之雜交和回交，經QTL解析和據圖選殖

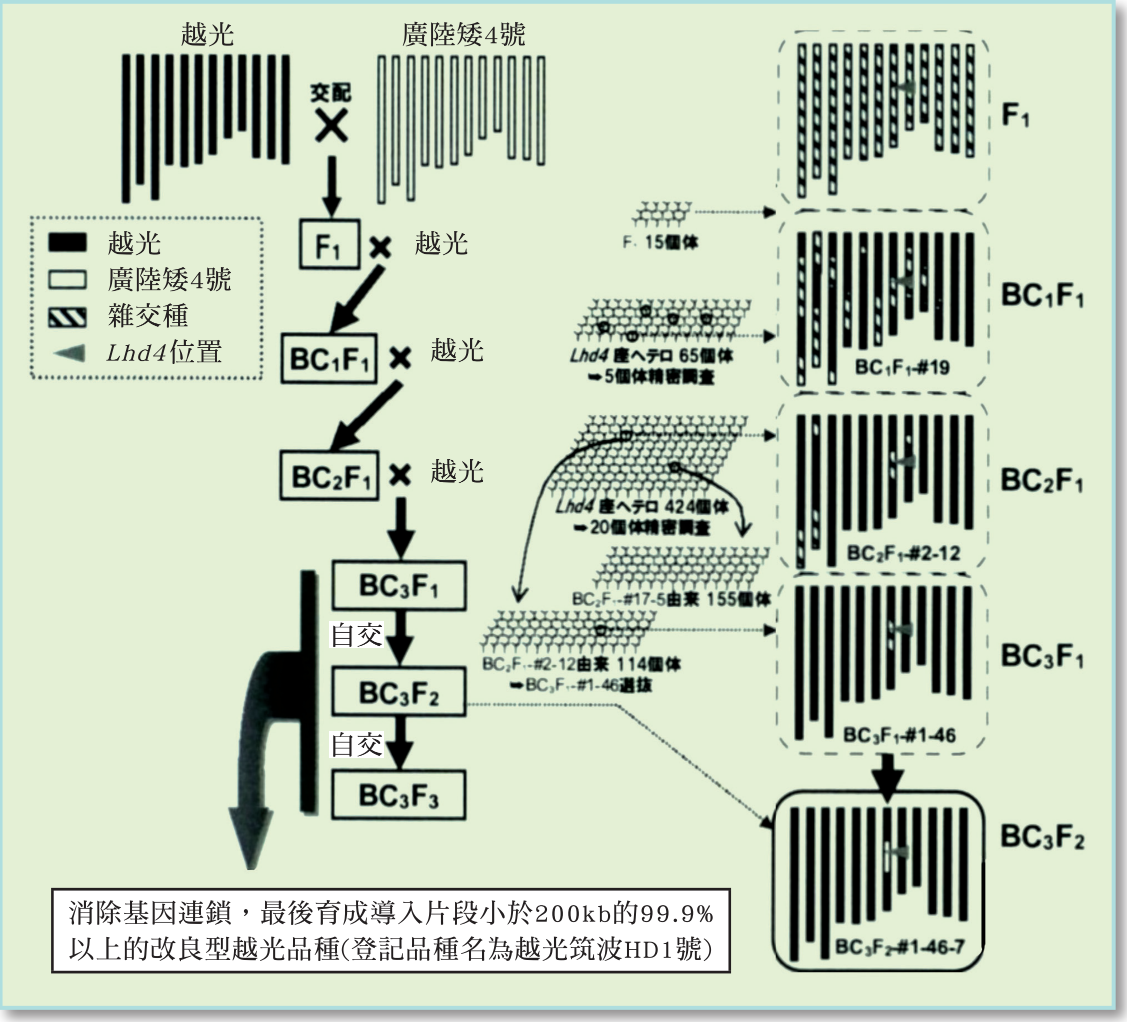


圖二、日本植物基因體中心(PGC)的水稻分子標誌輔助育種之策略流程。以育成改良越光品種開花期為例。
資料來源：(摘自PGC提供之文件資料)

(map-base cloning)，在第七條染色體上找到開花抑制基因*Lhd4*。能夠在北海道種植成功的水稻品種，就是因為*Lhd4*基因沒有作用，故欠缺抑制開花之機能，而導致這些北海道品種具有極早熟特性。

【步驟二】：進行分子標誌輔助育種必要之基礎準備。首先依照遺傳背景選擇親本，以日本改良越光品種開花期之MAS為例，需改良的越光品種作為母本（*Lhd4*基因有作用），而選擇極早熟特性的大陸品種－廣陸矮4號作為父本（Lhd4基因無作用）。PGC在選擇攜帶極早熟性狀的親本時，不考慮北海道現有品種，反而選擇大陸品種廣陸矮4號，是因為日本北海道水稻品種與越光都是來自於相同親本，親緣太近。從越光和廣陸矮4號的雜交中經基因構造解析，找出共174個SNP標誌，用以輔助選種。

【步驟三】：以分子標誌輔助育種導入基因座。以日本改良越光品種開花期之育種為例（如圖三），越光與廣陸矮4號雜交後，在溫室內與母本經一年3次回



圖三、越光與廣陸矮4號雜交後經回交3次，其間利用SNP標誌所製成之微陣列檢測晶片進行分離世代選拔，以導入開花期關連基因座，然後再經兩次自交及分子輔助選種過程，即可消除基因連鎖而育成越光筑波HD1號。
資料來源：(摘自PGC提供之文件資料)

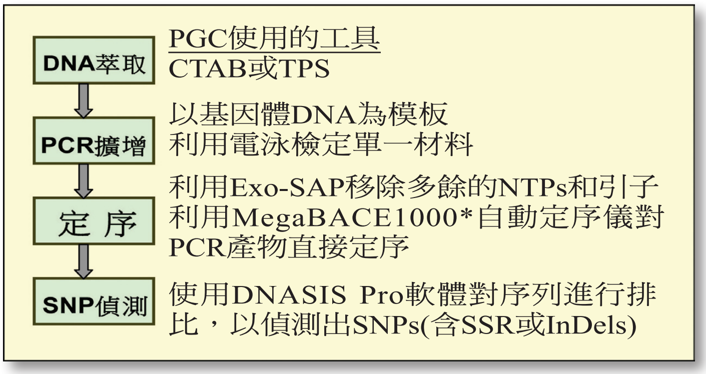
交，其間並以SNP標誌在分離世代中進行幼苗期性狀分析，以輔助選種，最終越光除了第7條染色體基因座上已成功轉入廣陸矮4號之*Lhd4*基因外，其他染色體之基因座則完全保持原有的基因。回交後再經兩次自交之選拔過程，即可消除基因連鎖，最後育成導入序列片段小於200kb的99.9%以上越光品種，品種申請登記為越光筑波HD1號。該新品種在日本的栽培面積正在急速擴大。

PGC利用了上述MAS策略流程，育成了不同開花期的改良型越光系統群 表一，不但擴大了越光品種在日本的適宜栽培地區，也展現了未來能將越光品種發展到全世界的企圖心。相對於傳統育種，PGC認為MAS在水稻的成功應用具有強大優勢，整理如表二。藉此育種策略，日本將水稻育種時間能由過去的15年縮短為3年，堪稱世界最快。

三、日本在水稻SNP標誌的開發與應用

狹義SNP指基因組序列上的單一個核苷酸改變。而日本PGC對於SNP，則採用較廣義的定義，即將SSR（simple sequence repeat, 是基因組中2-6個核苷酸微重複單位的簡單重複序列，又稱微衛星標誌）和InDel （插入或缺失之序列片段）包含在內。PGC尋找水稻SNP的流程如（圖四）所示，歷經DNA萃取、PCR擴增、定序，而後利用生物資訊軟體來偵測出SNP。

在找出SNP後，利用微陣列(microarray) 平台製作SNP微陣列檢測晶片 (SNP typing chip)，可用來進行品種鑑別及輔助選種，如圖五。PGC已將SNP應用到水稻品種鑑定之技術全面自動化，獲得10,000個以上SNP，藉此更建立相關資料庫（http://www.pgcdna.co.jp/snps/index.html），以對外受理需付費的品種鑑定技術和資料庫查詢服務。經由該豐富的SNP資料庫，只要使用2-4個標誌，就能將所有水稻品種區分開來（圖六）。該水稻SNP標誌資料庫之所以能



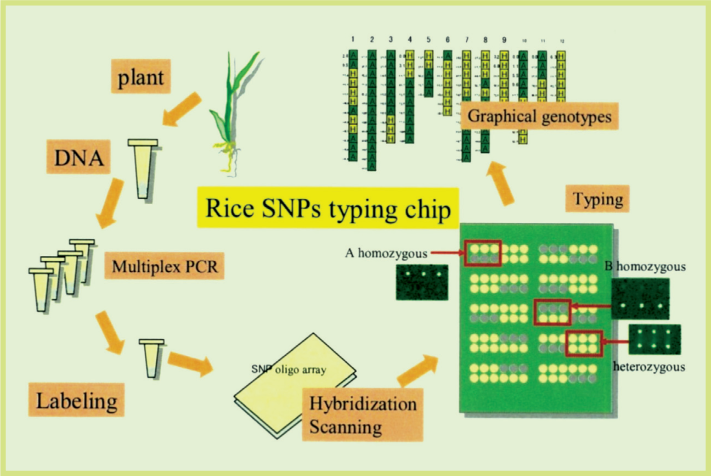
圖四、日本植物基因體中心(PGC)尋找水稻SNP的流程。
資料來源：(摘自PGC提供之文件資料)

表二、分子標誌輔助育種應用在水稻育種的優勢

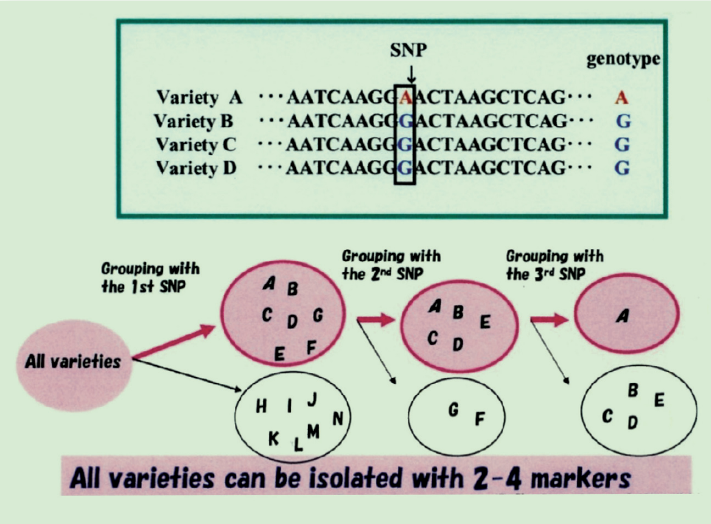
	分子輔助育種	傳統育種方法
育種期間	3年	15年
設施	溫室	試驗田
個體數	少數	多數
交配次數	3次/年	1次/年*
交配組合	遠緣雜交	近緣雜交
選拔標誌	DNA標誌	外表形態
選拔領域	點	全域
選拔效率	80%以上	50%
選拔階段	幼苗期	成熟期
固定化確認方法	DNA判定	性狀及形態評價
固定化確認期間	1年	數年

*日本水稻栽培一年一期作。
資料來源：(摘自PGC提供之文件資料)

夠建置成功，其背後主要是有日本的農林水產先端技術研究所 (STAFF) 和農業生物資源研究所 (NIAS) 資源豐沛的生物資訊資料庫在支援，如DNA、EST、cDNA、QTL等資料庫，這些資料庫都是公開在網路上可免費存取。此外，日本水稻基因體研究計畫 (RGP) 在水稻共32,000個基因中已確定了近30,000個基因的位置，更加速了這些資料庫的發展和應用價值。



圖五、鑑定品種用的SNP微陣列檢測晶片之製作流程。
資料來源：(摘自PGC提供之文件資料)



圖六、利用SNP標誌進行水稻品種鑑定。
資料來源：(摘自PGC提供之文件資料)

四、結 語

分子標誌研究與應用的迅速發展，為植物遺傳育種注入新的活力，將使傳統育種技術產生深刻的變化。DNA分子標誌研究始於1980年，現已有數十種標誌技術。儘管分子標誌有很多優點，但不同的分子標誌技術仍存在各自的缺點，使其應用受到限制。水稻基因體已完成定序，因此利用SNP標誌於水稻遺傳育種，將成為最簡便、快速、高效的分析手段。日本利用SNP標誌於水稻MAS，已取得相當不錯的進展，展現廣闊的應用前景。而我國農業在MAS的實際應用只是剛剛起步，若能汲取他人的成功經驗，相信可以減少MAS發展中可能遭遇到的難題。由參訪日本PGC見聞中，我們發現充分運用生物資訊與全面自動化所帶來的驚人效能。在全球競爭激烈的情勢下，我國在發展MAS核心技術和資訊平台之時，未必要從頭開始，應當充分利用日本已獲的各項資源，找出我國本土品種的分子標誌，以輔助育種；同時整合國內各研究人員所建之分子標誌的相關資訊，納入既有的作物品種資料庫，擇定能永續經營維護的農政單位來建置自有的分子標誌輔助育種之加值型資料庫及生物資訊平台，以提供資源分享、分工合作的管道，如此才能奠定成功關鍵的基礎，急追上世界研發潮流。